

APLICAÇÃO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA AO
ESTUDO DOS LATICÍFEROS EMBRIONÁRIOS DE
EUPHORBIA PULCHERRIMA WILLD *

por

F.R. MILANEZ e R.D. MACHADO

Os tubos laticíferos vêm sendo, de há muito, estudados por um de nós, especialmente quanto à sua origem.

Interessando-nos a investigação do mesmo assunto ao microscópio eletrônico, em cortes ultra-finos, aproveitamos a oportunidade do curso ministrado pelo Prof. K.R. Porter, em Julho de 1955 no Instituto de Biofísica, para levar a efeito nossas primeiras experiências.

O primeiro objeto examinado (MATERIAL I) consta de embrião pequeno (ca. de 1,5 mm) de *Euphorbia pulcherrima* Willd, que foi colocado no fixador, ácido ósmico a 1%, pH 6, temperatura ambiente, durante uma hora e, em seguida, cortado em fragmentos menores, que retornaram ao fixador por mais 15 minutos. Teve-se em vista, não só reduzir ao tamanho mais favorável para o corte, mas também permitir a extrusão de latex que fôsse diretamente atingido pelo fixador. Seguiram-se lavagem em tampão e água, desidratação em álcool etílico e inclusão em metacrilato. Realizou-se o corte ultra-fino ao micrótomo Porter-Blum do Instituto de Biofísica.

Já foram promissores êsses resultados preliminares, podendo-se assinalar nas correspondentes micrografias (ns. 5, 6, 7, 8 e 9) alguns fatos importantes.

Micro 5 — Temos repetidamente afirmado que os chamados tubos contínuos, ao invés de se constituírem de células únicas de cresci-

* 1.º Relatório apresentado ao Diretor do Instituto de Biofísica.

mento indefinido, como se assevera geralmente, resultam da fusão de vários elementos. Ainda mais, que essa fusão também se efetua, às vêzes, lateralmente, ocasionando o aumento de calibre do tubo. Na micro em análise observam-se, em *a*, vestígios seguros de união de dois protoplastas, aparecendo no limite respectivo uma fileira de vacúolos extremamente pequenos, invisíveis ao microscópio luminoso; em vários pontos das paredes laterais e especialmente em *c*, nota-se a dissolução da parede celular.

Micro 6 — Outro ponto sobre o qual temos insistido é a evolução especial de certos núcleos dos laticíferos, que muito se assemelha ao processo degenerativo descrito como *cariorexis*.

Assinalado em *a* encontra-se um núcleo em fase típica do mencionado processo: através da membrana descontínua ocorre extrusão da substância cromática.

Micros 7 e 8 — Desde que afirmamos serem os glóbulos de latex produzidos em plastídeos especiais — *galactoplastídeos*, temos procurado acompanhar nas células laticíferas a evolução do plastídoma. Estudos modernos, principalmente devidos a STRUGGER, demonstraram, nos meristemas, a presença de proplastídeos que se multiplicam por crescimento longitudinal e progressivo estrangulamento; sua estrutura foi também descrita como constando de um *granum*, ou diversos *grana*, imersos em matriz estromática. Durante a multiplicação divide-se, primeiramente, o *granum*. Por serem meristemáticos os tecidos do embrião, era de supor-se que contivessem proplastídeos; êstes deveriam ser muito numerosos nas células laticíferas, onde aparecerão mais tarde, na plântula, os galactoplastídeos. Guiados por essas considerações procuramos sempre nos cortes ultra-finos, os proplastídeos. Pudemos observar e micrografar, principalmente no latex que extravasa durante o seccionamento do material e se acumula na superfície dos fragmentos preparados, corpúsculos que pela forma, tamanho e estrutura acreditamos sejam os citados proplastídeos. A se confirmar nosso ponto de vista, serão essas as primeiras imagens electrônicas de proplastídeos em células de embrião, a serem divulgadas.

Micro 9 — Nos laticíferos *a* e *c*, cortados respectivamente em plano transversal e oblíquo, há também proplastídeos difíceis de distinguir pela grande densidade que apresenta o conteúdo celular ao feixe de electrons. Pelo mesmo motivo não é possível caracterizar outras partículas figuradas: mitocondrias e esferosomas.

Ocorreu-nos comparar os aspectos acima, com os da fixação que vinha sendo usada para o mesmo material no estudo com o microscópio luminoso.

Para isso, recuperamos de um bloco de parafina, material fixado em líquido de Benda, já examinado por meio de cortes em micrótomo comum (Spencer 820), incluindo-o em metacrilato e efetuando cortes ultra-finos (Material II).

Nas micrografias desta série (ns. 1, 2, 3 e 4) verifica-se de pronto a diferença da ação do fixador. O líquido de Benda, apesar de reputado como dos mais fiéis na citologia comum, não preserva, como foi revelado pelo microscópio electrónico, de maneira conveniente, as estruturas mais finas, notando-se plasmólise acentuada dos tubos laticíferos, com quebra da continuidade da superfície do protoplasma, e ausência dos detalhes finos, como os que permitem caracterizar os proplastídeos.

Como os estudos anteriores se baseavam na observação com o microscópio luminoso, iniciou-se o exame no microscópio electrónico com aumentos até 10.000 x, excepcionalmente 20 mil vezes. Convém assinalar, entretanto, que os fracos aumentos com o microscópio electrónico são muito úteis para proporcionar imagens semelhantes às penosamente obtidas próximo ao aumento útil máximo do microscópio luminoso, com grande vantagem em nitidez (ver micros 1 e 2).

Para estabelecer correlação com os aspectos já familiares, facilitar o enquadramento dos detalhes, e orientar a pesquisa no microscópio electrónico, mostrou-se conveniente, entretanto, examinar paralelamente os cortes com o microscópio luminoso.

Enquanto incluídos no metacrilato, os cortes ultra-finos, (colhidos em fragmentos de laminula, a que aderem por ligeiro aquecimento) são escassamente visíveis mesmo em contraste de fase.

Dissolvido o metacrilato com acetona, experimentamos diferentes meios de montagem. O ar ($n_D = 1$) confere bom contraste mas prejudica a resolução. O bálsamo do Canadá ($n_D = 1,52$) não permite contraste suficiente, ficando mesmo invisíveis alguns cortes. O "styrax" ($n_D 1,55$) e o "hyrax" ($n_D 1,65$), de acordo com o espécime e o tipo de contraste de fase usado, dão, ora um, ora outro, melhor imagem, (ver

micro n.º 1). Com êstes dois últimos meios de montagem, de índices de refração mais elevados, em geral, que os ocorrentes no material, se obtém, com o contraste de fase “claro” (“bright”) da American Optical Co. (correspondente ao contraste de fase positivo, segundo FRAÇON), uma imagem do tipo da do microscópio electrónico.

Acham-se presentemente em estudo oito blocos, de diferentes partes de embriões em várias fases de desenvolvimento.

Consta êste *Material III* de dois grupos. O primeiro compreende três embriões mais desenvolvidos, sendo um maduro, um quase maduro e o 3.º com cêrca de 3 mm. O segundo grupo constitui-se de dois embriões menores, um com 2 mm, outro com 1,5 mm.

Procedeu-se à fixação em ácido ósmico a 2% (pH 6), à temperatura ambiente, durante meia hora, quando foram os espécimes divididos em fragmentos de tamanho conveniente (exceto o menor, deixado inteiro) retornando ao fixador até completar-se uma hora. Seguiu-se lavagem em tampão e água, desidratação em álcool etílico em graduação lenta (2,5-5-7,5-10-15-20-30-50-70-85-85 e absoluto) e inclusão em metacrilato. Os cortes ultra-finos também foram obtidos no micrótomo Porter-Blum do Instituto de Biofísica. Já a êste material pertencem as micros ns. 10, 11, 12 e 13.

Micros 10 e 11 — Nesse embrião, muito mais desenvolvidos que o anterior, encontram-se proplastídeos (?) em diferentes estágios de diferenciação. Nos dois que aparecem abaixo (Micro 11). com maior aumento, observa-se estrutura aparentemente complexa. Além disso, o assinalado com *a* está visivelmente em ativa multiplicação.

Micro 12 — Proplastídeo (?) muito alongado, de outro campo microscópico, exhibe, aqui, curiosa estrutura. Será, possivelmente, o precursor de um amiloplasta que secretará um bastão de amilo, característico do gênero *Euphorbia*.

Micro 13 — SCHMALHAUSEN descobriu sob a epiderme dos cotilédones de *Euphorbia* um “retículo laticífero” que não foi observado por SCHULLERUS. CHAUVEAUD pôde ver os ramos finos dos tubos, mas negou que se anastomosassem em retículo. Um de nós teve ocasião de confirmar a presença do referido retículo e de fotografá-lo com microscópio luminoso, além de esclarecer sua origem

mediante a fusão de segmentos dos protoplastas epidérmicos e subepidérmicos. Assiste-se, nesta electromicrografia, a uma fase de sua formação. Em diversas células, individualizam-se através de condensação do citoplasma e acúmulo dos proplastídeos e outras partículas, os segmentos que irão fusionar-se. Em *a*, um segmento já individualizado; em *b*, outro que apenas esboça a citada individualização, em *c*, um segmento nucleado, iniciando a condensação mencionada.

São êsses os resultados conseguidos até agora, que nos animam a prosseguir no rumo que traçamos.

Consignamos aqui os nossos agradecimentos ao Prof. Carlos Chagas e a D. Herta Meyer pelas facilidades no uso do micrótomo Porter-Blum e do microscópio electrónico Phillips EM-100 do Instituto de Biofísica, e ao Prof. Joaquim Bertino de Moraes Carvalho, pelo uso do equipamento de microscopia e laboratório fotográfico, do Instituto de Óleos.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS

A fotomicrografia 1 da Estampa I foi obtida com microscópio de contraste de fase A.O.Co. objetiva 97 x. N.A. 1,25, contraste claro médio, lâmpada de filamento em fita, filtro Wratten n.º 62, no Instituto de Óleos, por *R.D. Machado*.

As demais micrografias foram conseguidas com microscópio electrónico Phillips EM-100 (filme 35 mm, Kodak Fine Grain Positive, não perfurado); as cópias ampliadas, por *R.D. Machado*, no referido Instituto de Óleos, foram preparadas de modo a aproveitar ao máximo a gama de tonalidades do papel, cuidadosamente escolhido para cada caso, a fim de evitar que qualquer parte da imagem ultrapassasse a escala útil do papel empregado.

- I — 1 — Material II (Corte ultrafino montado em "hyrax")
Laticífero ramificado no cotilédone.
2 — Material II — Laticífero ramificado no mesmo cotilédone — Assinalada com *a* a superfície do citoplasma, bastante afastada da parede (plasmólise) e descontínua.

- II — 3 — Material II — Extremidade de um laticífero.
a) Um dos proplastídeos perceptíveis, apesar da fixação.
b) Núcleo.
c) Glóbulo de reserva lipídica em célula vizinha.
d) Dissolução parcial da parede, evidenciando ação indutora do laticífero sobre a célula assinalada.

- III — 4 — Material I — Ramo laticífero cotiledonar.
- a) Reserva lipídica, ainda não completamente dissolvida no laticífero, denunciando formação recente deste à custa de células que a contêm habitualmente.
 - b) marcada descontinuidade da superfície do citoplasma.
 - c) núcleo alterado e mal fixado.
- IV — 5 — Material I — Dois laticíferos adjacentes, em formação, no hipocótilo.
- a) linha de fusão de dois protoplastas.
 - b) núcleo, em corte superficial.
 - c) um dos pontos em que ocorre dissolução nítida da parede separadora.
- V — 6 — Material I — Laticífero muito jovem no hipocótilo.
- a) núcleo em *cariorrhexis*, cuja membrana é tipicamente descontínua.
- VI — 7 — Material I — Células da superfície de secção do material fixado. Proplastídeos em multiplicação ativa.
- VII — 8 — Idem, idem — Vêem-se nitidamente os *grana*, alguns dos quais (um assinalado) parecem dividir-se.
- VIII — 9 — Material I Três laticíferos seccionados transversal (a) e obliquamente (b) e (c).
- IX — 10 — Material II — Proplastídeos em diversas fases de desenvolvimento na cavidade de um ramo laticífero.
- 11 — Os proplastídeos assinalados com *a* e *b*, vistos com maior aumento; o primeiro acha-se em multiplicação.
 - 12 — Outro proplastídeo, bastante alongado, possível precursor de amiloplasta.
- X — 13 — Material III — Corte paradérmico do cotilédone. 5.000x — Fase preparatória à formação do retículo subepidérmico.
- a) Segmento de protoplasta já individualizado;
 - b) Início da condensação de outro segmento;
 - c) Formação de um segmento nucleado; o núcleo alonga-se de modo característico.
 - d) Confluência de dois segmentos, com dissolução da parede separadora.

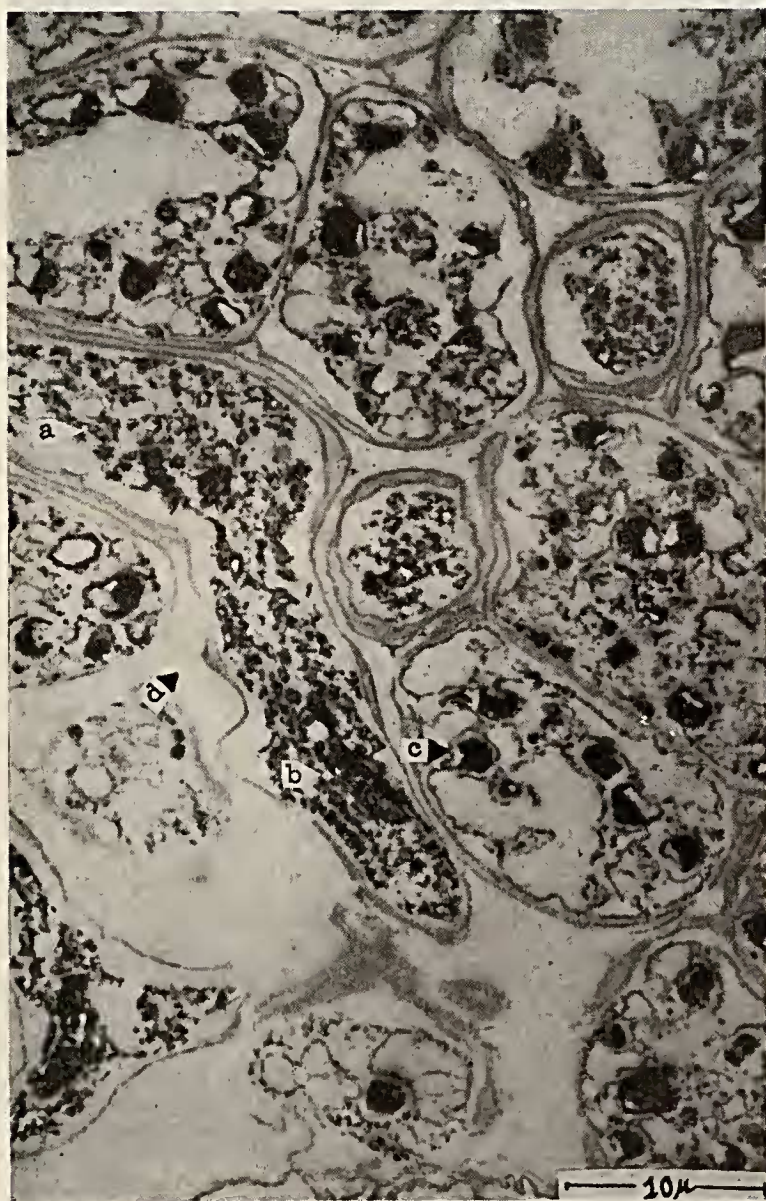




1



2

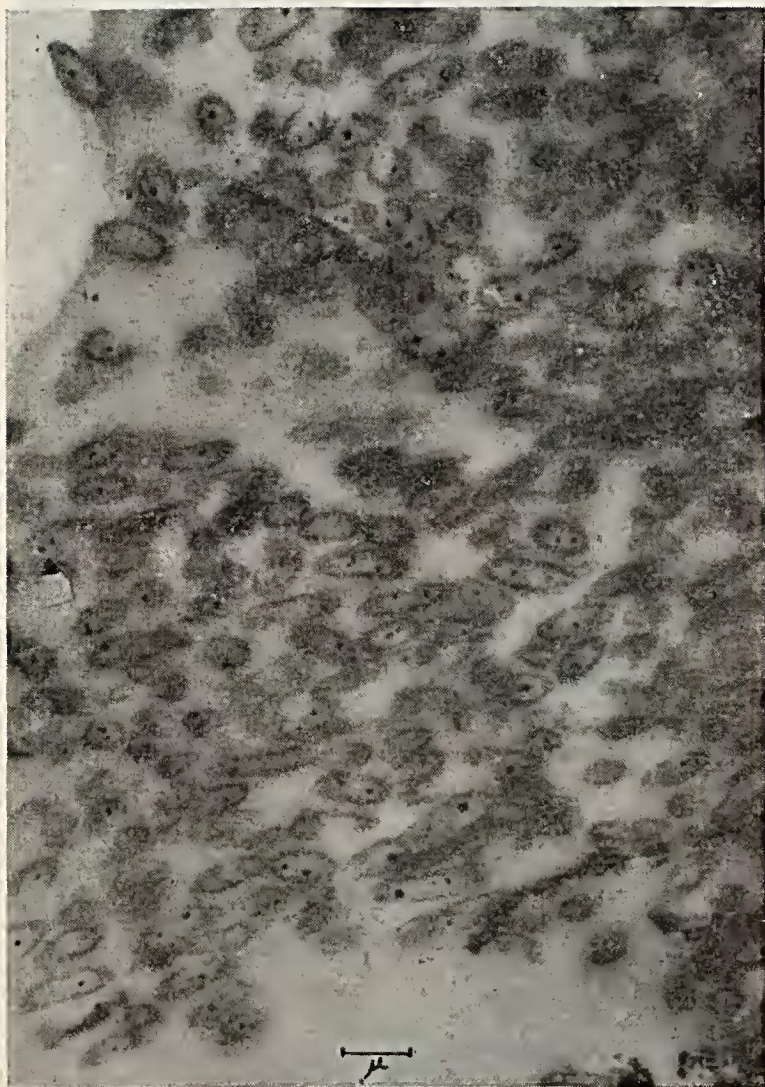
















10

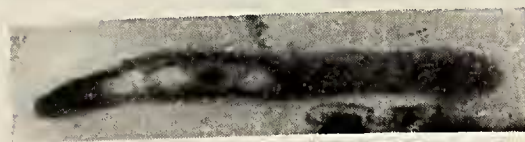
a ▶



b ▶



11



12

